

## Acute stress 가 마우스의 肝組織 및 血清內 RNase 와 RNase inhibitor 活性에 미치는 影響

Effect of acute stress on the activities of RNase and RNase inhibitor  
of liver and serum in mice

서울大學校 醫科大學 生化學教室

<指導 李 基 寧 教授>

崔 永 祐 · 安 賢 瑞

### I. 序 論

RNA 代謝 및 間接的으로 蛋白質合成과 密接한 關係를 갖고 있는 RNase(ribonuclease)와 RNase inhibitor에 關한 研究는 오래前 부터 많이 進行되어 왔으며 Groth<sup>1)</sup>는 RNase 가 RNA 的 分解를 촉진시켜 蛋白質合成을 抑制한다고 하였고 Umana<sup>2)</sup>는 蛋白質合成과 RNase活性은 逆比例한다고 하였으며 또 Roth<sup>3)</sup>은 組織內의 RNase는 alkaline과 acid의 두 type의 RNase가 存在함을 發表하였다. Roth<sup>4)</sup>는 組織內에는 RNase 뿐 아니라 RNase活性을 control하는 것으로 推測되는 RNase inhibitor가 存在함을 確認하였다. 即 그는 組織을 磨碎하여 homogenate를 超遠沈하여 microsome分割을 沈澱시켜 얻은 그 上清液에 RNase inhibitor가 多量存在함을 發見하였으며 特히 이 inhibitor는 大部分이 alkaline RNase에 作用하는 것으로 이 inhibitor는 65°C에서 5分間 加熱하면 不活性화되는 小分子의 蛋白質임을 認知하였다. 또한 Roth<sup>4, 5)</sup>는 RNase inhibitor가 SH reagent인 Pb<sup>++</sup> 혹은 P-chloromercuric benzoate (PCMB)의 存在로 抑制된다고 하였다.

Little<sup>6)</sup>과 Umeda<sup>7)</sup>에 依하면 組織內에서 RNase inhibitor는 RNase와 結合되어 있다하며 이 結合形의 RNase를 latent RNase라 부르고 latent RNase는 SH reagent를 加하면 RNase가 遊離된다고 하였다. 이와같이 RNase, RNase inhibitor 및 latent RNase의 相互關係는 蛋白質合成 및 成長과 密接한 關係가 있는 것으로 생각된다. 著者は acute stress가 이

相互關係에 어떤 影響을 줄것이냐에 對하여 흥미를 느낀바 있어 celite<sup>16)</sup>를 마우스 腹腔內에 注射하여 acute stress를 준後 時間別로 RNase, RNase inhibitor 및 latent RNase活性 關係를 調査하고 한편 副腎皮質비타민 C等을 살펴 흥미있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

### II. 實驗材料 및 實驗方法

實驗材料: 體重 15g 內外의 雄性마우스를 指定하여 同一한 食餌 및 其他生活條件으로 一週間 飼育한後 實驗動物로 使用하였다. acute stress로는 celite (Mallinckrodt)를 蒸溜水에 浮游시켜 마우스 體重 10g當 celite 0.5mg 이 되게 腹腔內에 注射하였다.

實驗方法: 마우스를 每群當 6마리씩 다음과 같은 時間別로 5群으로 區分하여 celite 浮游液의 腹腔內注射로 stress를 준後 4時間, 8시간, 12시간, 16시간 및 20시간의 間隔으로 對照群(celite 浮游液代身 蒸溜水를 注射)과 같이 斷頭로 犠牲시켜 即時 採血한後 곧 開腹하여 臟器를 摘出한後 所要組織의 一定量을 秤量하여 實驗에 供하였다.

被驗組織의 RNase酵素液調製는 Roth<sup>4)</sup> 方法에 依하여 秤量한 組織을 冷冰下에서 冷蒸溜水로 Teflon homogenizer를 使用하여 磨碎한後 International Model PR-2 冷凍遠心分離機로 500×g에서 10分間 遠沈하여 細胞核과 未破碎細胞等을 除去한後 그 上清液을 RNase酵素測定用 試料로 하였다.

RNase活性測定은 Roth<sup>3)</sup>法에 準하여 上記 酵素用 試料 1.0ml에다 Vischer & Chargaff<sup>8)</sup>法으로 精製한

RNA의 1%溶液 1.0ml를 加하여 alkaline RNase活性測定用으로는 pH 7.7의 veronal acetate buffer 1.0ml를 또 acid RNase活性測定用으로는 pH 5.5 veronal acetate buffer 1.0ml를 加하여 37°C에서 30分間放置한後 acid-alcohol溶液(蒸溜水 30ml에 濃 HCl 20ml를 加한 다음 酒精으로 全量이 250ml가 되게 稀釋한것) 3ml를 加하고 0°C에서 數時間放置한後 遠沈하여 上清液을 取한 다음 波長 260m $\mu$ 에서 Beckman DU spectrophotometer를 使用하여 酵素活性을 测定하였다.

血清 RNase活性도 血清 1.0ml에다 1% RNA溶液 1.0ml를 加하여 上記한바 同一한 條件으로 测定하였으나 37°C의 肝置時間만은 10分으로 하였다.

Total alkaline RNase活性測定: total alkaline RNase活性測定은 pH 7.7 veronal acetate buffer에다 醋酸鉛을 Pb<sup>++</sup>濃度가 1.0×10<sup>-2</sup>M 되게 加한 溶液 1ml를 加하여 肝組織의 total alkaline RNase活性을 测定하고 血清試料에는 1.5×10<sup>-2</sup>M의 Pb<sup>++</sup>濃度를 가진 同一한 buffer 1ml을 加하여 测定하였다. latent alkaline RNase活性은 total alkaline RNase活性值에서 alkaline RNase活性值(Pb<sup>++</sup>을 添加치 않은)를 뺀것으로 삼았다.

#### 비타민 C 测定方法:

비타민 C 测定方法은 Roe<sup>9</sup>法에 準하였다. 即 마우스 3 마리분의 副腎을 pool로 하여 그一定量을 秤量한 다음 5% trichloroacetic acid(TCA)溶液 5ml로 Teflon homogenizer를 使用하여 磨碎한後 0°C에 4時間放置하고 遠沈으로 除蛋白하였다.

그 上清液을 5% TCA溶液으로 3倍로稀釋하여稀釋液 1.5ml를 試驗管에 넣고 따로 準備한 두 試驗管에다 각各 標準液 1.5ml(標準用)와 蒸溜水 1.5ml(盲驗用)를 加한 다음 上記 세 試驗管에다 각各 2% 2,4-dinitrophenylhydrazine試藥 0.5ml 씩 넣고 38°C에서 4時間放置시킨 다음 冷却을 기다려 各試驗管에다 다시 65% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5ml를 加하고 잘 混合한後 波長 540m $\mu$ 에서 Spectronic 20 spectrophotometer를 使用하여 比色測定하였다.

### III. 實驗結果

RNase가 그 inhibitor와 結合되어 있는 狀態를 latent RNase라 하며 이 latent RNase는 Pb<sup>++</sup> 혹은 PCMB를 加하면 inhibitor가 離脫되어 RNase가 遊離된다. 即 Pb<sup>++</sup> 또는 PCMB는 RNase inhibitor와 結合하여 그作用을 抑制한다. 本實驗에서는 inhibitor抑制에 있어 Pb<sup>++</sup>의 最適濃度를 알기 위하여 肝組織 500mg을 25ml의 冷蒸溜水로 RNase酵素液을 抽出하여 抽出液 1ml에 각各濃度가 다른 即 5×10<sup>-3</sup>M, 1×10<sup>-2</sup>M, 1.5×10<sup>-2</sup>M

및 2×10<sup>-2</sup>M의 Pb<sup>++</sup>溶液 1ml 씩을 加하여 inhibitor에 서 遊離된 alkaline RNase活性을 調査한結果 RNase inhibitor抑制에 있어 Pb<sup>++</sup>의 最適濃度值는 1.0×10<sup>-2</sup>M이었다(第1圖). 한편 acid RNase活性에 있어서는 Pb<sup>++</sup>添加로 變動이 없는 것으로 보아 latent RNase는 存在하지 않는 것으로 볼 수 있다(第2圖). 또 同一한 方法으로 血清을 10倍로稀釋하여 测定한結果 第3圖에서 보는 바와같이 血清에서는 1.5×10<sup>-2</sup>M에서 Pb<sup>++</sup>의 最適濃度值를 나타냈다(第3圖).

肝組織 acid RNase活性은 stress를 받은後 8時間에서는 41%나 減少하였지만 그後부터는漸次增加하여

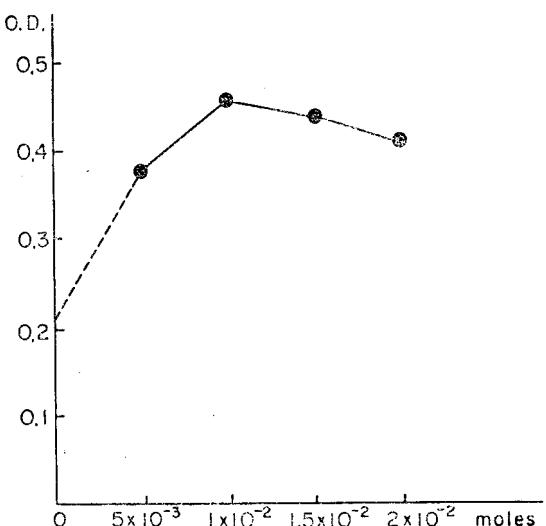


Fig. 1. The effect of Pb<sup>++</sup> concentration on the alkaline RNase activity of mouse liver.

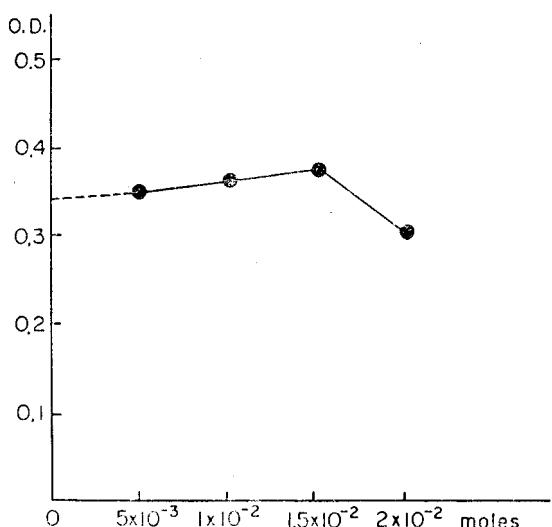


Fig. 2. The effect of Pb<sup>++</sup> concentration on the acid RNase activity of mouse liver

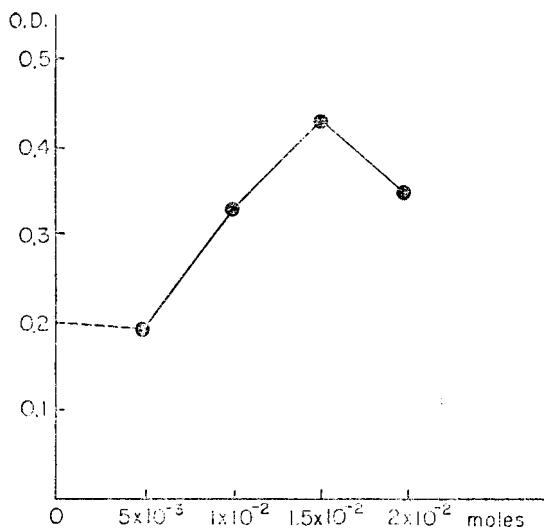


Fig. 3. The effect of  $Pb^{++}$  concentration on the alkaline RNase activity of mouse serum

20時間後는 原狀으로 回復하였다. 그러나 alkaline total RNase는 acute stress로 變化를 주지 못하였으나 alkaline RNase活性은 stress後 時間經過에 따라 계속 減少하여 12時間에서는 36%까지 低下되었다가 그後는 漸次 原狀으로 復歸되었다. 한편 latent RNase活性은 stress後 8時間부터 僅少하나마 增加하기 시작하여 20時間에서는 15%의 增加率를 보여주고 있다(第1, 2, 3 및 4表, 第4圖).

血清 total alkaline RNase活性에 있어서도 肝組織에 서와 마찬가지로 거의 變化가 없었으나 alkaline RNase

Table 1. Variation of liver acid RNase activity after acute stress

Experiment No \ Hours	control	4	8	12	16	20
1	4.26	4.20	2.97	3.75	3.55	4.08
2	5.05	3.95	3.81	3.23	3.18	4.01
3	5.80	2.24	1.95	2.91	3.66	4.49
4	4.61	3.41	2.68	2.72	3.81	4.19
5	4.25	3.71	2.62	3.31	3.55	5.23
6	4.42	4.18	3.21	4.78	2.80	4.12
Mean	4.73	3.61	2.87	3.45	3.42	4.35
S. D.	$\pm 0.55$	$\pm 0.67$	$\pm 0.61$	$\pm 0.42$	$\pm 0.29$	$\pm 0.43$

The activity was expressed as mg RNA split per mg nitrogen tissue per 30 minutes

Table 2. Variation of liver total alkaline RNase activity after acute stress

Experiment No \ Hours	control	4	8	12	16	20
1	4.75	4.23	4.90	4.23	4.68	5.35
2	4.89	4.61	4.75	4.33	3.67	4.01
3	5.28	3.93	4.02	3.52	4.20	4.50
4	4.94	4.18	4.23	4.11	4.81	4.25
5	4.67	4.00	4.14	4.42	4.11	4.74
6	4.82	4.55	4.07	4.28	4.75	4.95
Mean	4.89	4.25	4.35	4.15	4.37	4.68
S. D.	$\pm 0.19$	$\pm 0.22$	$\pm 0.34$	$\pm 0.29$	$\pm 0.41$	$\pm 0.44$

The activity was expressed as mg RNA split per mg nitrogen tissue per 30 minutes

Table 3. Variation of liver alkaline RNase activity after acute stress

Experiment No \ Hours	control	4	8	12	16	20
1	3.17	2.71	2.65	2.06	2.05	2.67
2	3.47	3.62	2.67	2.54	2.60	2.77
3	3.29	2.75	2.52	1.76	2.83	2.17
4	3.21	3.13	2.54	2.20	2.81	2.03
5	3.13	2.50	2.62	2.05	2.23	3.18
6	3.12	1.95	2.35	2.85	2.23	3.45
Mean	3.13	2.78	2.56	2.24	2.46	2.71
S. D.	$\pm 0.12$	$\pm 0.51$	$\pm 0.11$	$\pm 0.34$	$\pm 0.31$	$\pm 0.47$

The activity was expressed as mg RNA split per mg nitrogen tissue per 30 minutes

Table 4. Variation of liver alkaline latent RNase activity after acute stress

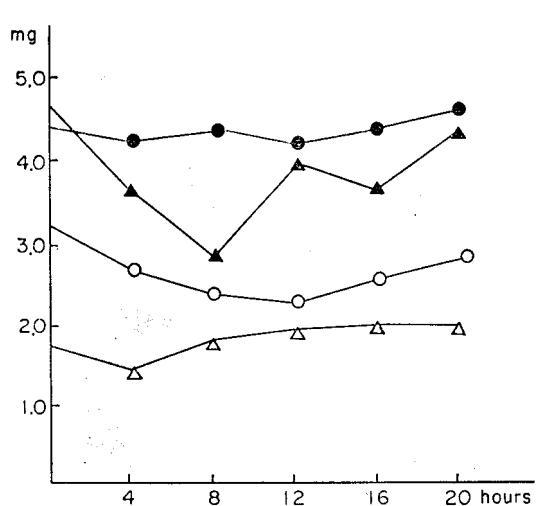
Experiment No \ Hours	control	4	8	12	16	20
1	1.57	1.51	2.25	2.16	2.63	2.67
2	1.42	0.98	2.07	1.78	1.07	1.23
3	1.99	1.17	1.50	1.76	1.32	2.33
4	1.73	1.04	1.69	1.91	2.00	2.22
5	1.53	1.50	1.52	2.36	1.88	1.55
6	1.70	2.60	1.71	1.42	2.51	1.49
Mean	1.66	1.47	1.79	1.90	1.90	1.92
S. D.	$\pm 0.18$	$\pm 0.54$	$\pm 0.26$	$\pm 0.30$	$\pm 0.57$	$\pm 0.50$

The activity was expressed as mg RNA split per mg nitrogen tissue per 30 minutes

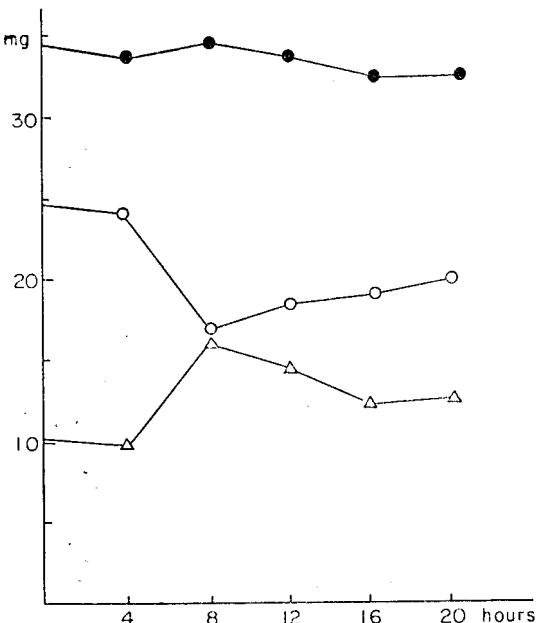
**Table 5.** Variation of serum total alkaline RNase activity, alkaline RNase activity and latent RNase activity after acute stress

	Hours Experiment No	control	4	8	12	16	20
Total alkaline RNase	1	35.00	32.50	34.25	32.50	32.50	31.25
	2	34.37	34.75	35.00	33.70	32.50	33.75
	mean	34.68	33.62	34.62	33.10	32.50	32.50
Alkaline RNase	1	25.00	24.37	18.12	18.75	18.75	20.00
	2	24.50	25.00	15.62	18.12	19.37	20.00
	mean	24.75	24.68	16.87	18.43	19.06	20.00
Latent RNase	1	10.00	9.37	16.12	13.75	11.75	11.25
	2	9.87	9.75	19.37	15.57	12.12	13.75
	mean	9.93	9.56	17.75	14.66	12.43	12.50

The activity was expressed as mg RNA split per ml serum per 10 minutes.



**Fig. 4.** Variation in the liver total alkaline RNase activity (●), latent RNase activity (△), alkaline RNase activity(○) and acid RNase activity (▲) after acute stress



**Fig. 5.** Variation in the serum total alkaline RNase activity(●), latent RNase activity(△) and alkaline RNase activity (○) after acute stress

活性은 stress 後 8時間에서는 32%가 減少되었다가 그後부터는 漸次 增加하여 原狀으로 回復되었다. 또 latent RNase 活性은 stress 後 8時間에서 28%가 增加한後 減少하기 시작하여 20時間에서는 對照值에 接近하였다(第5表, 第5圖).

한편 副腎비타민 C도 stress 를 받은後 8時間에 53%나 激減되었다가 漸次增加하여 20時間에는 對照值로 復歸되었다(第6表, 第6圖).

	Hours	control	4	8	12	16	20
Experiment No							
1	control	7.82	5.52	3.55	5.07	5.07	8.69
2	control	7.24	5.07	3.55	4.71	5.79	7.82
Mean	control	7.53	5.79	3.55	4.89	5.43	8.46

The content was expressed as mg per 100mg nitrogen tissue homogenate.

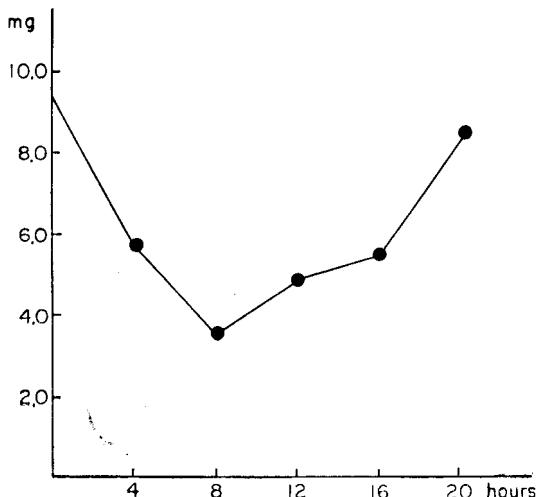


Fig. 6. Variation in the adrenal ascorbic acid content after acute stress

### III. 考 察

Roth<sup>4</sup> 와 Little<sup>5</sup> 은 白鼠肝組織을 磨碎하여 homogenate 를 超遠沈한 上清液에 RNase inhibitor 가 多量存在하고 또 이 inhibitor 는 RNase 와 結合되어 있음을 發見하고 이와같이 結合된 形態의 RNase 를 latent RNase 라 命名하였다.

本實驗結果에도 肝組織 RNase inhibitor 는 大部分 alkaline RNase 와 結合되어 있으나 acid RNase 에는 inhibitor 가 作用하지 않음을 觀察하여 latent RNase 가 存在하지 않음을 確認하였다. 肝組織의 total alkaline RNase 的 活性은 acute stress 를 加한 後 別變動이 없는데 反하여 alkaline RNase活性은 減少되었고 latent RNase 的活性은 增加하였다. 이와같은 latent RNase 的 增加는 inhibitor 的 增加에 起因하는것으로 생각된다. Majumdar<sup>6</sup> 等에 依하면 RNase inhibitor 的 增加로 蛋白質合成이 增加한다고 하며, hortman<sup>11</sup> 은 partial hepatectomy 를 하여 肝組織 RNase inhibitor 가 增加한다고 報告하고 또 Little<sup>6</sup> 은 筋萎縮症에 있어서는 latent RNase 的活性이 減少한다고 發表하였다. 以上 文獻으로 보아 本實驗에서 acute stress 後 latent RNase活性이 增加한것은 蛋白質合成에 관여되는 RNA의 分解를 抑制하는 自己保護作用으로 생각되며 Groth<sup>12</sup> 가 말한바와같이 RNase의 增加는 蛋白質合成을 抑制한다는 點으로 보아 RNase의活性 減少는 inhibitor 와 많이 結合되어 latent RNase의 增加로 RNA 分解를 抑制하여 酵素合成에 支障이 없게하는 것이라고 볼수 있다. 血清 total alkaline RNase活性도 acute stress 를 하여 變動이 없으나 latent RNase의活性은 增加하였다.

Levy<sup>13</sup> 은 血清 alkaline RNase活性이 病的in 狀態에서는 增加한다고 하였으며 또 Tsukada<sup>14</sup> 도 acute stress 로 하여 血清 RNase活性이 減少함을 報告하였다. Monier<sup>15</sup>에 依하면 白鼠는 cold stress로 하여 尿의 비타민 C 排泄量이 增加된다고 하고 Stewart<sup>16</sup> 과 Lahiri<sup>17</sup> 은 corticotrophin 흄몬을 白鼠에 投與하면 肝, 腎, 脾組織 및 血液의 비타민 C는 增加하고 副腎의 비타민 C는 減少하며 stress 만으로도 副腎의 비타민 C量이 減少한다고 報告하였다. 本實驗에서 副腎의 비타민 C가 減少된것을 보더라도 celite가 acute stress로써 充分히 作用하여 흄몬分泌가 促進되었음을 알 수 있다.

### IV. 結論

實驗動物로 마우스를 使用하여 celite 浮游液의 腹腔內 注射로 acute stress를 加한 後 4時間, 8시간, 12시간, 16시간 및 20시간等의 時間經過에 따르는 肝組織 및 血清 RNase活性과 RNase inhibitor의活性를 測定하고 한편 celite가 acute stress로 作用하였는지 그 與否를 가리기 위하여 副腎비타민 C量의 變動을 아울러 調査하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

- 1) 肝組織 acid RNase活性은 acute stress를 加한 後 8시간에 41%나 急激히 減少되었다.
- 2) 肝組織 및 血清의 total alkaline RNase의活性은 別變動이 없으나 肝組織 alkaline RNase活性은 12시간에서 31%, 血清 alkaline RNase活性은 8시간에서 32%로 각각 減少하였다.
- 3) 肝組織 RNase inhibitor는 alkaline RNase와 結合되어 있으나 acid RNase와는 結合되어 있지 않다.
- 4) Celite에 依한 acute stress로 副腎 비타민 C含量은 stress를 받은지 8시간 後에 53%나 激減되고 그 後부터는 漸次 增加하여 20시간에 對照值로 復歸되었다.

### ABSTRACT

#### Effect of Acute Stress on the Activities of RNase and RNase inhibitor of Liver and Serum in mice

Young Jo Choi, Hyun Jin Ahn

Department of Biochemistry of College of Medicine  
Seoul National University

Acute stress was induced to the mice by intra-peritoneal injection of celite suspension. The activities of RNase and RNase inhibitor were examined

on the liver and serum with the time intervals of 4, 8, 12, 16 and 20 hours after induction of acute stress, and adrenal ascorbic acid was also determined to testify the effectiveness of such a stress inducing method.

The results obtained are as follows.

1. The activity of hepatic acid RNase was markedly decreased as much as 41%, as compared to control value, 8 hours after inducing acute stress.

2. No change was observed in the activity of hepatic and serum total RNase by acute stress, but the activity of liver alkaline RNase was decreased 31% 12 hours following acute stress and that of serum alkaline RNase was decreased 32% 8 hours after inducing stress. The lowered RNase activities were gradually increased to normal value 20 hours after celite injection. The acute stress was thus shown to induce a marked decrease in RNase activities of the liver and serum,

3. The hepatic RNase inhibitor was confirmed to be bound to alkaline RNase, but not to acid RNase.

4. The content of adrenal ascorbic acid was diminished gradually from the initiation of acute stress, reaching to minimum level 8 hours after initiating celite induced stress, followed by gradual increase to control level.

## REFERENCES

1. Groth, D.P., *Biochim. Biophys. Acta.*, **21**, 18 (1956)
2. Umana, R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**, 767, (1969)
3. Roth, J.S. and Milsten, S.W., *J. Biol. Chem.*, **196**, 489 (1952)
4. Roth, J.S., *Biochim. Biophys. Acta.*, **21**, 34 (1956)
5. Roth, J.S., *J. Biol. Chem.*, **231**, 1097 (1958)
6. Little, B.W. and Meyer, W.L., *Science*, **170**, 13 (1970)
7. Umeda, T., Moriyama, T., Oura, H. and Tsukada, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **171**, 260 (1969)
8. Vischer, E. and Chargaff, E., *J. Biol. Chem.*, **196**, 489 (1952)
9. Roe, J.H. and Keuther, C.A., *J. Biol. Chem.*, **147**, 399 (1943)
10. Majumdar, C., Tsukada, K. and Lieberman, I., *J. Biol. Chem.*, **242**, 700 (1967)
11. Shortman, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 50 (1962)
12. Levy, A.L. and Rotino, A., *J. Am. Assoc. Clin. Chem.*, **6**, 43 (1960)
13. Tsukada, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **186**, 21 (1969)
14. Monier, M.M. and Weiss, R.J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, **80**, 446 (1952)
15. Stewart, C.P., Horn, D.B. and Robson, J.S., *Biochem. J.*, **53**, 254, (1953)
16. Lahiri, S. and Lloyd, B.B., *Biochem. J.*, **84**, 478 (1962)